

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-330581

(43)Date of publication of application : 30.11.2001

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/483

(21)Application number : 2000-147688

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 19.05.2000

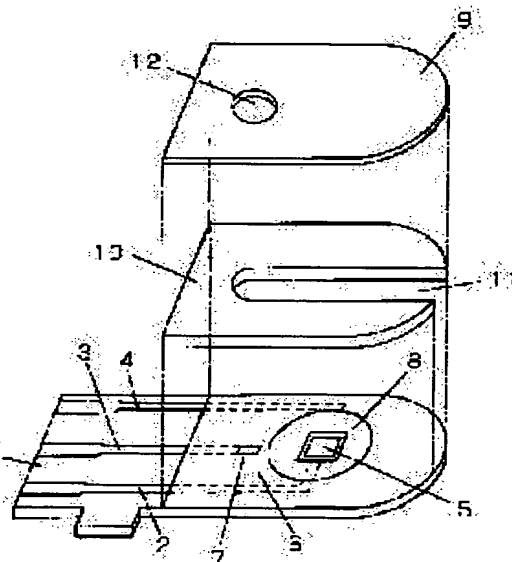
(72)Inventor : IKEDA MAKOTO
NANKAI SHIRO

(54) SUBSTRATE CONCENTRATION DETERMINATION METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a substrate concentration determination method capable of determining the supply state of sample liquid easily and surely, and having high precision and little dispersion.

SOLUTION: This substrate concentration determination method includes a process for judging the necessity of execution of a substrate concentration determination process, based on a period of time from the contact of the sample liquid with a working electrode 5 and a counter electrode 8 until the contact thereof with a liquid junction detection electrode 7, by using a biosensor in which the working electrode 5, the counter electrode 8, the liquid junction detection electrode 7, a reagent layer and a sample liquid supply opening 11 are provided and the liquid junction detection electrode 7 is arranged on the position separated from the sample liquid supply opening 11 furthermore than the working electrode 5 and the counter electrode 8.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-330581
(P2001-330581A)

(43)公開日 平成13年11月30日(2001.11.30)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テームコード*(参考)

G 0 1 N 27/327
27/416
33/483

G 0 1 N 33/483
27/30
27/46

F 2 G 0 4 5
3 5 3 R
3 5 3 Z
3 3 6 B
3 3 6 C

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願2000-147688(P2000-147688)

(22)出願日 平成12年5月19日(2000.5.19)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74)代理人 100097445

弁理士 岩橋 文雄 (外2名)

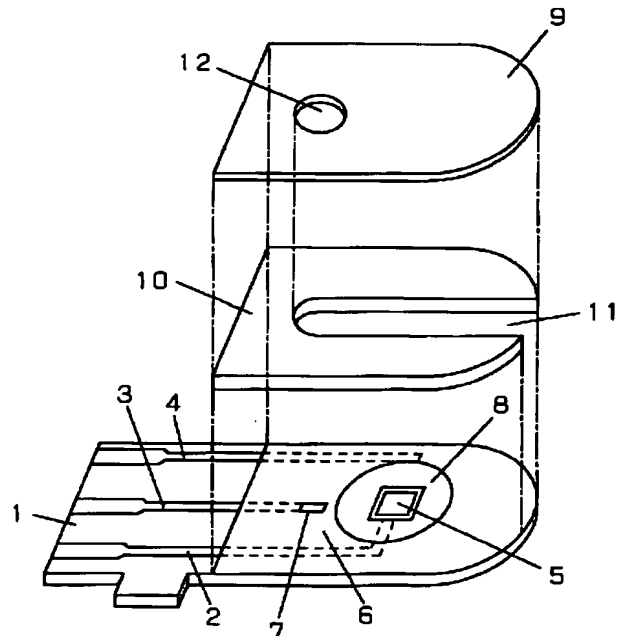
Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 CA25 CB03 DA31
FB05 GC20 HA09 HA14

(54)【発明の名称】 基質濃度定量法

(57)【要約】

【課題】 試料液の供給状態を容易かつ確実に判別することができ、高精度で、ばらつきが少ない基質濃度定量法を提供する。

【解決手段】 作用極5、対極8、液絡検知電極7、試薬層及び試料液供給口11を備え、液絡検知電極7が、作用極5及び対極8よりも試料液供給口11から離れた位置に配置されているバイオセンサを用い、試料液が作用極5及び対極8に接触してから液絡検知電極7に接触するまでの時間に基づいて、基質濃度定量工程の実施の要否を判断する工程を含む、基質濃度定量法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】作用極、対極、液絡検知電極、少なくとも酵素及び電子伝達体を包含する試薬層、並びに試料液供給口を備え、前記液絡検知電極が、前記作用極及び前記対極よりも前記試料液供給口から離れた位置に配置されているバイオセンサを用い、前記作用極に前記電子伝達体を酸化する電位を印加する工程（A）及び前記作用極と前記対極間の電流値を測定する工程（B）を有する基質濃度定量工程において得られた前記電流値に基づいて試料液中の基質濃度を定量する基質濃度定量法であって、少なくとも、前記試料液供給口から前記試料液を供給する工程（C）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知する工程（D）、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知する工程

（E）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触してから、前記試料液が前記液絡検知電極に接触するまでの時間（T1）を計測する工程（F）、前記T1に基づいて前記基質濃度定量工程の実施または中止を決定する工程（G）、及び前記決定に基づいて前記基質濃度定量工程を実施または中止する工程（H）を含むことを特徴とする基質濃度定量法。

【請求項2】工程（D）において、作用極と対極間の電気的信号の変化により、試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知し、工程（E）において、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電気的信号の変化により、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知し、工程（F）において、前記作用極と前記対極間の電気的信号の変化を検知してから、前記作用極と前記液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知するまでの時間（T2）を計測し、前記T2をT1とすることを特徴とする、請求項1記載の基質濃度定量法。

【請求項3】少なくとも工程（D）の前に、作用極と対極間に電圧を印加する工程を有し、かつ少なくとも工程（E）の前に、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間に電圧を印加する工程を有することを特徴とする、請求項2記載の基質濃度定量法。

【請求項4】少なくとも工程（D）の前に、作用極、対極及び液絡検知電極に電位を印加する工程を有することを特徴とする、請求項2記載の基質濃度定量法。

【請求項5】作用極、対極及び液絡検知電極が同一基板上に配置されているバイオセンサを用いることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の基質濃度定量法。

【請求項6】作用極及び対極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用いることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の基質濃度定量法。

【請求項7】試薬層及び液絡検知電極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用い、対極と前記液絡検知電極間の電流値を測定することにより妨害物質の検知を行う工程を有することを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の基質濃度定量法。

【請求項8】液絡検知電極が参照極として機能することを特徴とする、請求項1～7のいずれかに記載の基質濃度定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオセンサを用いた基質濃度定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】スクロース、グルコースなど糖類の定量分析法として、施光度計法、比色法、還元滴定法および各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法はいずれも、糖類に対する特異性があまり高くないので精度が悪い。また、これらの方法のうち施光度計法は、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、施光度計法は、一般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。

【0003】ところで、近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。

【0004】以下に、試料液中の基質の定量法の一例としてグルコースの定量法について説明する。電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC1. 1. 3. 4：以下GODと略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用して行う方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサ」講談社）。

【0005】GODは、酸素を電子伝達体として、基質であるβ-D-グルコースをD-グルコノ-δ-ラクトンに選択的に酸化する。酸素の存在下で、GODによる酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計る。酸素の減少量及び過酸化水素の増加量は、試料液中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースの定量が行われる。

【0006】上記方法では、その反応過程からも推測できるように、測定結果は試料液に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点があり、また試料液に酸素が存在しない場合では測定が不可能となる。

【0007】そこで、酸素を電子伝達体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子伝達体として用い

る新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子伝達体の還元体を電極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料液中に含まれるグルコース濃度が求められる。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子伝達体として用いることで、既知量のGODとそれらの電子伝達体を安定な状態で正確に電極上に担持させて試薬層を形成することが可能となる。この場合、試薬層を乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のバイオセンサが近年多くの注目を集めている。その代表的な例が、特許第2517153号公報に示されるバイオセンサである。このバイオセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサに試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定器で測定することができる。このような手法は、グルコースの定量だけに限らず、試料液中に含まれる他の基質の定量にも応用可能である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記のようなバイオセンサでは、二電極間（作用極と対極間）の抵抗値の変化に基づいて試料液の供給を検知し、検知をトリガーとして基質の測定を開始する場合が多い。しかしながらこのような検知法の場合、二電極間に試料液が達すれば、試料液の供給量が不十分で、両電極が十分に試料液に接していない状態でも基質の測定が開始する場合があり、測定結果にばらつきが生ずる場合があった。

【0009】また、作用極及び対極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されている場合、目視によっても、試料液のセンサへの供給が判別し難く、上記と同様の問題が生じる場合があった。

【0010】これらの問題を解決するため、作用極及び対極に加えて、液絡検知用電極として使用される第3の電極を、作用極及び対極よりも試料液供給口から離れた位置に備えたバイオセンサ及びそれを用いた基質の定量法が、特開平8-320304号公報に開示されている。これによると、試料液の反応層への供給によって生じた、対極と第3の電極との間の電気的変化を検知することにより、試料液の供給を確実に検知することができる。

【0011】しかし、このバイオセンサ及びそれを用いた基質の定量法では、試料量不足を補うために再度試料の供給を実施した場合であっても測定が開始するので、正確な測定結果が得られないことがあった。

【0012】さらに、妨害物質の影響や、参照極を用いないことにより生ずる印加電圧の摂動を抑制することが要望されていた。

【0013】そこで本発明は、上記の問題点に鑑み、試料液の供給状態を容易に判別することができ、高精度で、ばらつきが少ない基質濃度定量法を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明による基質濃度定量法は、作用極、対極、液絡検知電極、少なくとも酵素及び電子伝達体を包含する試薬層、並びに試料液供給口を備え、前記液絡検知電極が、前記作用極及び前記対極よりも前記試料液供給口から離れた位置に配置されているバイオセンサを用い、前記作用極に前記電子伝達体を酸化する電位を印加する工程（A）及び前記作用極と前記対極間の電流値を測定する工程（B）を有する基質濃度定量工程において得られた前記電流値に基づいて試料液中の基質濃度を定量する基質濃度定量法であって、少なくとも、前記試料液供給口から前記試料液を供給する工程（C）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知する工程（D）、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知する工程（E）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触してから、前記試料液が前記液絡検知電極に接触するまでの時間（T1）を計測する工程（F）、前記T1に基づいて前記基質濃度定量工程の実施または中止を決定する工程（G）、及び前記決定に基づいて前記基質濃度定量工程を実施または中止する工程（H）を含むことを特徴とする。

【0015】ここで、工程（D）において、作用極と対極間の電気的信号の変化により、試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知し、工程（E）において、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電気的信号の変化により、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知し、工程（F）において、前記作用極と前記対極間の電気的信号の変化を検知してから、前記作用極と前記液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知するまでの時間（T2）を計測し、前記T2をT1とすることが好ましい。

【0016】また、少なくとも工程（D）の前に、作用極と対極間に電圧を印加する工程を有し、かつ少なくとも工程（E）の前に、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間に電圧を印加する工程を有することが好ましい。

【0017】また、少なくとも工程（D）の前に、作用極、対極及び液絡検知電極に電位を印加する工程を有してもよい。

【0018】また、作用極、対極及び液絡検知電極が同一基板上に配置されているバイオセンサを用いてもよい。

【0019】また、作用極及び対極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用いてもよい。

【0020】また、試薬層及び液絡検知電極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用い、対極と前記液絡検知電極間の電流値を測定

することにより妨害物質の検知を行う工程を有することが好ましい。

【0021】また、液絡検知電極が参照極として機能することが好ましい。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を説明する。

【0023】上記の課題を解決するために、本発明による基質濃度定量法は、作用極、対極、液絡検知電極、少なくとも酵素及び電子伝達体を包含する試薬層、並びに試料液供給口を備え、前記液絡検知電極が、前記作用極及び前記対極よりも前記試料液供給口から離れた位置に配置されているバイオセンサを用い、前記作用極に前記電子伝達体を酸化する電位を印加する工程（A）及び前記作用極と前記対極間の電流値（以下、応答電流値と略称する）を測定する工程（B）を有する基質濃度定量工程において得られた前記応答電流値に基づいて試料液中の基質濃度を定量する基質濃度定量法であって、少なくとも、前記試料液供給口から前記試料液を供給する工程（C）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知する工程（D）、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知する工程（E）、前記試料液が前記作用極及び前記対極に接触してから、前記試料液が前記液絡検知電極に接触するまでの時間（T1）を計測する工程（F）、前記T1に基づいて前記基質濃度定量工程の実施または中止を決定する工程（G）、及び前記決定に基づいて前記基質濃度定量工程を実施または中止する工程（H）を含むことを特徴とする。

【0024】この方法によると、T1に基づいて試料液の供給状態を容易かつ確実に判別することができ、試料液が適切に供給された場合のみ、基質濃度定量工程が実施されるので、高精度でばらつきの少ない測定を行うことができる。

【0025】本発明の好ましい態様においては、工程（D）において、作用極と対極間の電氣的信号の変化により、試料液が前記作用極及び前記対極に接触したことを検知し、工程（E）において、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電氣的信号の変化により、前記試料液が前記液絡検知電極に接触したことを検知し、工程（F）において、前記作用極と前記対極間の電氣的信号の変化を検知してから、前記作用極と前記液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間の電氣的信号の変化を検知するまでの時間（T2）を計測し、前記T2をT1とする。

【0026】この方法によると、試料液が各電極に接触したことを電氣的信号の変化から容易に検知することができ、かつ、T2をT1として用い、T2に基づいて試料液の供給状態を容易かつ確実に判別することができ、試料液が適切に供給された場合のみ、基質濃度定量工程が実施されるので、高精度でばらつきの少ない測定を行

うことができる。

【0027】また、本発明による基質濃度定量法は、少なくとも工程（D）の前に、作用極と対極間に電圧を印加する工程を有し、かつ少なくとも工程（E）の前に、前記作用極と液絡検知電極間、または前記対極と前記液絡検知電極間に電圧を印加する工程を有することが好ましい。

【0028】また、少なくとも工程（D）の前に、作用極、対極及び液絡検知電極に電位を印加する工程を有していてもよい。このようにすると、電圧または電位を印加する工程が少なくなり、工程数を低減することができる。

【0029】本発明の基質濃度定量法において、作用極、対極及び液絡検知電極が同一基板上に配置されているバイオセンサを用いても良い。

【0030】また、作用極及び対極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用いても良い。

【0031】また、試薬層及び液絡検知電極が、空間部を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを用い、対極と前記液絡検知電極間の電流値を測定することにより妨害物質の検知を行う工程を有することが好ましい。ここで、妨害物質とは、基質濃度定量工程において、作用極または対極上で電気化学的に反応することにより、応答電流値に影響を与えて基質濃度の測定結果に誤差を生じさせる物質のことであり、例えば、アスコルビン酸、尿酸等の易酸化性物質が挙げられる。このようにすると、試料液中の基質と試薬層中の酵素及び電子伝達体との反応により生じた反応物質が液絡検知電極に到達する前に、試料液が液絡検知電極に接触するので、試料液が液絡検知電極に接触してから、前記反応物質が液絡検知電極に到達するまでの間に、対極と液絡検知電極間の電流値を測定することにより、容易に妨害物質の検知を行うことができる。従って、試薬層妨害物質検知用に新たに電極を追加することなく、測定結果から妨害物質の影響を除くことができるので、センサ構成を複雑にしたり製造工程を煩雑にしたりすることなく、高精度な基質濃度の定量を行うことができる。

【0032】また、液絡検知電極が参照極として機能することが好ましい。このようにすると参照極用に新たに電極を追加することなく、作用極の電位を安定させることができるため、センサ構成を複雑にしたり製造工程を煩雑にしたりすることなく、基質濃度に対して良好な直線性を有する応答電流値が得られるので、高精度な基質濃度の定量を行うことができる。

【0033】本発明において、試薬層に含有される酵素としては、試料液に含まれる基質に応じて適切なものを選択される。酵素としては、例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシ

ダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどがあげられる。

【0034】また、電子伝達体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体などがあげられる。また、酸素を電子伝達体とした場合にも電流応答が得られる。電子伝達体は、これらの一種または二種以上が使用される。

【0035】

【実施例】以下、本発明の実施例を、図1～3を用いて説明する。図1～3は本発明の実施例におけるグルコースセンサの試薬層を除去した状態の分解斜視図である。

【0036】(実施例1) バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。本実施例では図1に示すグルコースセンサを使用した。このグルコースセンサは、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1と、カバー9と、基板1およびカバー9の間に挟まれるスペーサ10とを有する。これらは図1中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着されてグルコースセンサが構成される。

【0037】スペーサ10には試料液供給口11が形成され、また、カバー9には空気孔12が形成されている。基板1上にスペーサ10を介してカバー9を積層接着すると、基板1、スペーサ10及びカバー9によって試料液供給口11に通じる空間部(図示しない)が形成され、空間部の終端部は空気孔12に連通する。

【0038】基板1には、作用極5、対極8、及び液絡検知電極7が設けられ、さらにこれらに電気接続されるリード2、3、4が設けられている。作用極5は、リング状の対極8の内側に配置されている。液絡検知電極7は、作用極5及び対極8よりも試料液供給口11から離れた位置に配置されている。

【0039】上記グルコースセンサは以下のようにして作製した。

【0040】ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3、4をそれぞれ形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極5を形成した。作用極5はリード2と接触している。

【0041】次に、その基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成した。絶縁層6は、作用極5の外周部を覆っており、これによって作用極5の露出部分の面積は一定に保たれる。絶縁層6は、リード2、3、4の一部を覆っている。リード3の先端を露出させることにより、液絡検知電極7を形成した。

【0042】次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード4と接触するように基板1上に印刷して対極8を形成した。

【0043】次に、作用極5及び対極8上にカルボキシ

メチルセルロース(以下、CMCと略称する)水溶液を滴下し、乾燥させることでCMC層を形成した。さらに、CMC層上に、酵素としてGOD、電子伝達体としてフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることで試薬層を形成した。

【0044】次に、上記試薬層上に、試料液の試薬層への供給をより一層円滑にするために、レシチンのトルエン溶液を、試料液供給口11から試薬層上にわたって広げ、乾燥させることでレシチン層を形成した。なお、レシチン層を形成するためにトルエンを用いたが、他の有機溶媒を用いてもよい。次に、基板1に、カバー9及びスペーサ10を図1中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してグルコースセンサを作製した。

【0045】このグルコースセンサを測定器(図示せず)に装着し、まず、作用極5と対極8間に500mVの電圧を印加した。次にこのセンサに、試料液としてグルコース濃度定量に十分な量の血液を試料液供給口11より供給した。毛管現象により血液が空間部に導入され、血液が作用極5まで達して作用極5に接触すると、測定器が、作用極5と対極8間における電気的信号の変化として、電気抵抗値の変化を検知した。この変化の検知と同時に測定タイマーが始動し、次に、作用極5と液絡検知電極7間に500mVの電圧を印加した。作用極5、対極8に引き続き、血液が液絡検知電極7にまで到達して液絡検知電極7に接触すると、作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じ、その変化を測定器で検知した。ここで、測定タイマーが始動してから作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じるまでの時間(以下、T2と略称する)を、測定タイマーにより計測した。

【0046】この試料供給検知工程に引き続き、基質濃度定量工程を実施した。作用極5と液絡検知電極7間における電気抵抗値の変化を検知してから25秒経過後に500mVの電位を作用極5に印加し、5秒後に作用極5と対極8間の電流値を測定した。血液中のグルコースと、試薬層から溶解したフェリシアン化イオン及びGODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンを作用極5において酸化することで電流応答が得られる。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した応答電流値が得られた。

【0047】電極配置、測定環境(温度、湿度等)、血液性状(ヘマトクリット値、粘度等)の個人差等にもよるが、十分な量の血液が供給された場合、試料液が作用極及び対極に接触してから、試料液が液絡検知電極に接触するまでの時間(以下、T1と略称する)は長くて1～2秒程度である。またここで、T2はT1とほぼ等しいとみなすことができる。そこで、T2が2秒以下の場合に得られた定量結果と、T2が2秒を超えた場合に

得られた定量結果とを比較したところ、T2が2秒以下の場合に得られた結果では、測定値の精度、ばらつきが大幅に抑制されていた。T2が2秒を超えた場合は、1回の試料供給で十分な量の試料が供給されなかった場合、または試料量不足を補うため再度試料の供給を実施した場合が考えられ、これにより定量結果に影響が生じたものと考えられる。

【0048】このような試料量不足による測定誤差を軽減するために、T2を計測する工程の後に、T2が2秒以下の場合には以降の基質濃度定量工程を実施し、T2が2秒よりも大きい場合には中止するように判断する工程を測定器に組み込み、同様の測定を行った。その結果、1回で十分な量の試料が供給された場合のみ測定が実施されるようになったため、測定誤差は大幅に軽減された。

【0049】(実施例2)本実施例では、実施例1と同様のグルコースセンサを使用した。

【0050】このグルコースセンサを測定器に装着し、対極8を基準にして、作用極5と対極8間に500mV、対極8と液絡検知電極7間に500mVの電圧を印加した。次にこのセンサに、試料液としてグルコース濃度定量に十分な量の血液を試料液供給口11より供給した。毛管現象により血液が空間部に導入され、血液が作用極5に達すると、測定器が作用極5と対極8間における電気抵抗値の変化を検知し、それと同時に測定タイマーが始動した。作用極5、対極8に引き続き、血液が液絡検知電極7にまで到達して液絡検知電極7に接触すると、作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じ、その変化を測定器で検知した。ここで、測定タイマーが始動してから作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じるまでの時間(T2)を、測定タイマーにより計測した。

【0051】この試料供給検知工程に引き続き、基質濃度定量工程を実施した。対極8と液絡検知電極7間における電気的信号の変化を検知してから25秒経過後に500mVの電位を作用極5に印加し、5秒後に作用極5と対極8間の電流値を測定した。その結果、実施例1と同様に、試料液中のグルコース濃度に依存した応答電流値が得られた。

【0052】実施例1と同様に、T2が2秒以下の場合に得られた定量結果と、T2が2秒を超えた場合に得られた定量結果とを比較したところ、T2が2秒以下の場合に得られた結果では、測定値の精度、ばらつきが大幅に抑制されていた。

【0053】そこで、T2を計測する工程の後に、T2が2秒以下の場合には以降の基質濃度定量工程を実施し、T2が2秒よりも大きい場合には中止するように判断する工程を測定器に組み込み、同様の測定を行った。その結果、1回で十分な量の試料が供給された場合のみ測定が実施されるようになったため、実施例1と同様に、測定誤差は大幅に軽減された。

に、測定誤差は大幅に軽減された。

【0054】(実施例3)本実施例では、図2に示すグルコースセンサを用いた。

【0055】ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、パラジウムからなる電極及びリードを形成した。次に、試料供給口11を有するスペーサ10を、図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって基板1に接着し、作用極5、対極8、液絡検知電極7及びリード2、3、4を区画した。区画内に実施例1と同様に試薬層を作製した後、空気孔12を有するカバー9を貼り合わせることで、グルコースセンサを作製した。

【0056】実施例1と同様に、試料供給検知工程及び基質濃度定量工程により、血液中のグルコース濃度の測定を行った結果、実施例1と同様の効果が得られ、T2に基づいた判別を行うことで試料量不足による測定誤差は大幅に抑制された。

【0057】なお、本実施例におけるグルコースセンサの場合、試料供給口11より供給された試料液は対極8、作用極5を順次経て、最後に液絡検知電極7へと到達するように各電極が配置されているが、これに限定されず、対極8と作用極5の配置が逆で、作用極、対極、液絡検知電極の順に試料が到達する場合においても、同様の結果が得られた。

【0058】(実施例4)本実施例では、図3に示すグルコースセンサを用いた。

【0059】ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の作用極基板13上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2を形成した。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを作用極基板13上に印刷して作用極5を形成した。この作用極5は、リード2と接触している。さらに、作用極基板13上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成した。絶縁層6は、作用極5の外周部を覆っており、これにより作用極5の露出部分の面積を一定に保っている。

【0060】同様の手順にて、絶縁性の対極基板14上に対極8及び液絡検知電極7を形成した。

【0061】実施例1と同様にして作用極5上に試薬層を作製した後、作用極基板13、空気孔12を備えた対極基板14及びスペーサ10を図3中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製した。スペーサ10には、両基板間に試料液供給路を形成するためのスリットが設けてある。試料供給口11は、その試料供給路の開口部に相当する。

【0062】ついで、血液中のグルコースの測定を行った。まず、作用極5と対極8間に500mVの電圧を印加した。次にこのセンサに、試料液として、妨害物質であるアスコルビン酸を含むグルコース濃度定量に十分な量の血液を試料液供給口11より供給した。毛管現象により血液が空間部に導入され、血液が作用極5に達して作用極5に接触すると、測定器が作用極5と対極8間に

おける電気抵抗値の変化を検知した。この電気抵抗値変化の検知と同時に測定タイマーが始動し、次に、作用極5と液絡検知電極7間に500mVの電圧を印加した。作用極5、対極8に引き続き、血液が液絡検知電極7にまで到達して液絡検知電極7に接触すると、作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じ、その変化を測定器で検知した。ここで、測定タイマーが始動してから作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値に変化が生じるまでの時間(T2)を、測定タイマーにより計測した。次に、このT2が2秒以下であったことから以降の基質濃度定量工程を行うことを決定した。

【0063】次に、作用極5と液絡検知電極7間の電気抵抗値変化を検知するのとはほぼ同時に、液絡検知電極7と対極8間に500mVの電圧を100ミリ秒間印加し、両電極間の電流値(以下、I1と略称する)を測定した。I1は、妨害物質として含まれるアスコルビン酸の酸化反応に起因し、その濃度に対して比例関係を与えた。I1の測定後、液絡検知電極7と対極8間の電圧印加を解除した。

【0064】上述したように、液絡検知電極7は、試薬層が配置されていない対極基板14上に配置されている。よって、酵素反応の結果生成したフェロシアン化イオンが液絡検知電極7近傍に到達するまでには、若干の時間を必要とする。すなわち、フェロシアン化イオン到達までの時間内における液絡検知電極7と対極8間の電流値I1は、主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。

【0065】I1を測定してから約25秒経過後に、500mVの電位を作用極5に印加し、5秒後の応答電流値I2を測定した。この応答電流値I2は、試料中のグルコース濃度に比例するフェロシアン化イオンと、試料中にあらかじめ存在するアスコルビン酸の酸化反応に起因する。すなわち、アスコルビン酸が測定結果に正の誤差を与えることとなる。そこで、電流値I1に基づいて応答電流値I2を補正することにより得られた電流値I3より、アスコルビン酸の影響を除去し正確なグルコース濃度を求めることができる。

【0066】本実施例によれば、液絡検知電極7が妨害物質検知電極としても機能することにより、妨害物質の影響を補正することができるので、妨害物質検知用に新たに電極を追加することなく、より高精度な基質の測定が可能となった。

【0067】(実施例5)実施例4と同様のグルコースセンサを用い、実施例4と同様の手順にて、血液中のグルコースの測定を行った。但し、作用極5と対極8間の応答電流値を得るために電位印加を行う際、液絡検知電極7を基準にして、700mVの電位を作用極5に印加し、200mVの電位を対極8に印加した。すなわち、液絡検知電極7を参照極として用いた三電極式での測定を行った。

【0068】その結果、作用極5の電位が安定したことにより電位摂動の影響が抑制されたため、グルコース濃度に対する応答電流値の直線性が向上した。

【0069】本実施例によれば、液絡検知電極7は、妨害物質検知電極及び参照極としての併用ができるので、妨害物質検知電極または参照極用として新たに電極を追加することなく、より高精度な基質の測定が可能となった。

【0070】なお、上記の実施例において、試料液検知、妨害物質検知及び基質濃度定量のために電極系へ印加する電位または電圧値を記載したが、これに限定されることはない。試料液検知の際には電気的信号の変化が観察される電位または電圧、妨害物質検知の際には妨害物質が電極上で反応する電位または電圧、また基質濃度定量の際には一連の反応の結果生じた電子伝達体の還元体が酸化される電位または電圧であればよい。

【0071】また、基質濃度定量工程の実施または中止を判断する工程において、T2と比較する時間を2秒に設定しているが、これに限定されることはない。T2は、電極間距離、試料の粘度、温度等を因子とする値であり、これらの因子に応じて適切な時間が設定される。また、電流値を測定する時間についても、実施例に記載の特定値に限定されることはない。

【0072】実施例1及び実施例3～5では、試料液が液絡検知電極に接触したことを確認するために、作用極と液絡検知電極間に電圧を印加し、作用極と液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知したが、これに代えて、対極と液絡検知電極間に電圧を印加し、対極と液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知してもよい。また、実施例2では、試料液が液絡検知電極に到達したことを確認するために、作用極と液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知したが、これに代えて、対極と液絡検知電極間の電気的信号の変化を検知してもよい。

【0073】また、上記実施例では、試料液が各電極に接触したことを確認するために、電気的信号として、電気抵抗値の変化を検知したが、これに限定されず、電流値、電極電位、容量成分等の変化を検知してもよい。

【0074】上記実施例では、センサ構造の例を図示したが、電極及びリードの形状、電極及びリードの配置、センサ部材の組み合わせ方法等はこれらに限定されるものではない。

【0075】また、上記実施例では、電極材料としてカーボンまたはパラジウムについて述べたが、これに限定されることはない。作用極材料としては、電子伝達体を酸化する際にそれ自身が酸化されない導電性材料であれば使用できる。また、対極材料としては、銀、白金等の一般的に用いられる導電性材料であれば使用できる。また電極系の作製法もスクリーン印刷法、スパッタリング法に限定されず、蒸着法等、他の手法にて作製された電極系でも使用できる。

【0076】また、試薬層を作用極に固定化することによって、酵素や電子伝達体を不溶化させてもよい。固定化する場合は、架橋固定法あるいは吸着法が好ましい。また、酵素や電子伝達体を電極材料中に混合させてもよい。

【0077】

【発明の効果】以上のように本発明によると、試料液の供給状態を容易かつ確実に判別することができ、高精度で、ばらつきが少ない基質濃度定量法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサの試薬層を除去した状態の分解斜視図

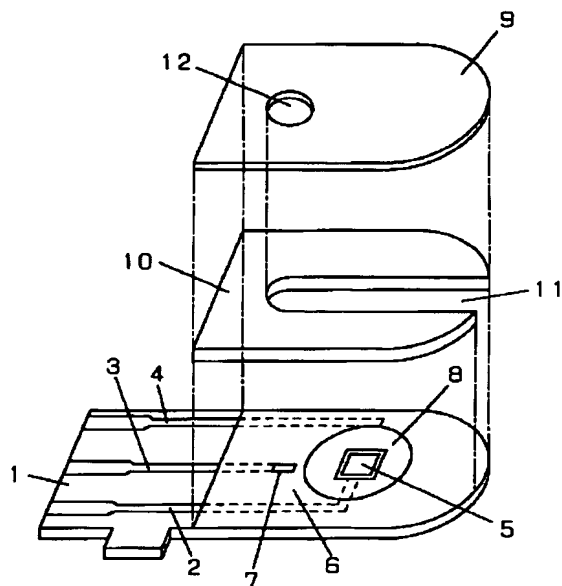
【図2】本発明の他の実施例におけるグルコースセンサの試薬層を除去した状態の分解斜視図

【図3】本発明のさらに他の実施例におけるグルコースセンサの試薬層を除去した状態の分解斜視図

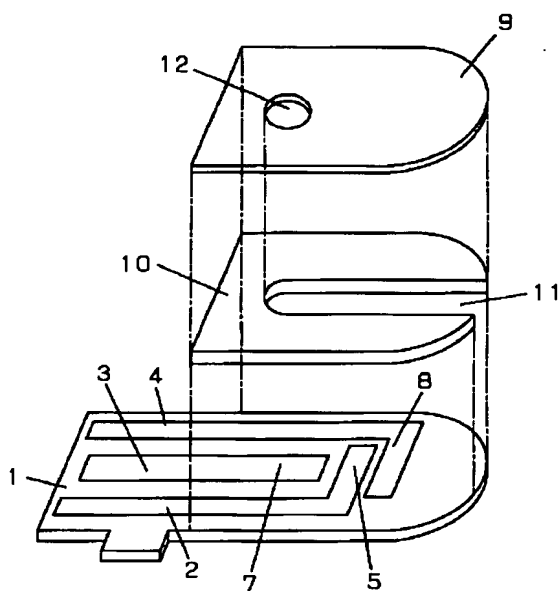
【符号の説明】

- 1 基板
- 2, 3, 4 リード
- 5 作用極
- 6 絶縁層
- 7 液絡検知電極
- 8 対極
- 9 カバー
- 10 スペース
- 11 試料液供給口
- 12 空気孔
- 13 作用極基板
- 14 対極基板

【図1】



【図2】



【図3】

